

## Serex 技术筛选 SLE 新抗原临床研究进展\*

甘德芳<sup>1</sup>, 何帮顺<sup>2</sup>, 陈兴国<sup>2</sup>综述, 夏永祥<sup>2△</sup>审校(1. 江苏省南京市江宁区第二人民医院检验科 211103; 2. 南京医科大学  
附属南京第一医院医学检验科 210006)**关键词:** 红斑狼疮, 系统性; Serex 技术; SLE 新抗原**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.02.022**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)02-0180-03

Serex 技术是基于体液免疫的重组 cDNA 文库的血清学分析方法, 简便易行。其原理是利用分子克隆技术和将患者自体血清对抗原的自体分型技术融为一体, 不仅可检测抗体反应, 而且能在抗原与患者自体血清反应的基础上直接从分子水平确定具有免疫原性的抗原。此方法的流程主要是以新鲜组织或细胞样本构建 cDNA 文库并连接入噬菌体表达载体, 以重组的噬菌体转染大肠杆菌, 将细菌表达的重组蛋白转移至膜上, 与稀释后的患者自体血清共孵育, 用酶联特异性抗人 IgG 二抗识别与高滴度血清抗体反应的克隆, 阳性克隆随后亚克隆化, 分离出单个插入片段, 并确定此插入 cDNA 的核苷酸序列, 在相应的数据库中进行比对, 确认其染色体定位和推测可能的功能作用, 最后分析该基因的组织表达谱<sup>[1]</sup>。Serex 技术在科研及临床工作中应用越来越广泛, 本文就 Serex 技术作一阐述。

### 1 Serex 技术特点

**1.1** 采用新鲜细胞样本构建 cDNA 文库, 避免了体外培养细胞以及因过度培养细胞导致的相关抗原基因缺失或不表达。

**1.2** 将患者血清稀释至 1:100~1:1 000, 仅检测高滴度的 IgG 抗体, 使得免疫分析仅限于可诱导出强免疫反应(在同源宿主体内)及有共同 T 细胞辅助的抗原。

**1.3** cDNA 表达克隆的血清分析, 不仅限于分析表面抗原, 其涵盖了由靶基因编码的蛋白质。

**1.4** 与单克隆抗体技术比较, Serex 技术是运用多特异性血清抗体检测在溶解的细菌斑中高度富集的单克隆抗原。因为靶抗原的 cDNA 序列可以直接测定, 所以也可推导确定抗原的氨基酸序列。

**1.5** 运用 Northern blots 和 PCR 检测抗原的 mRNA 的表达确定靶抗原的组织表达谱。但 Serex 技术也不能检测所有抗原, 如糖基化的抗原决定簇和在细菌中表达时发生构像改变的抗原决定簇可能被漏检。此外, 对某些在组织发展的不同阶段表达的抗原, 若取新鲜组织标本的时间与该抗原表达的阶段不一致, 也可被漏检。尽管如此, Serex 技术仍不失为一种有效、方便的鉴定靶抗原的方法。

### 2 SLE 的基本特征及治疗现状

系统性红斑狼疮(SLE)在中国人群中的患病总人数达一百万。迄今发病机制未明, 2004 年中华医学会组织全国风湿病专家, 结合国际先进的诊治知识, 编写颁布了风湿病诊疗指南, 大大促进了风湿病诊治水平的规范、普及、提高。然而, 国内外在治疗方面没有取得突破性进展, 尚缺乏特异、有效的治疗手段, 仍以糖皮质激素和非特异性免疫抑制剂为主, 副作用较大, 常反复发作, 导致病情进一步恶化甚至感染死亡。对患者的结局, 国外有专家曾描述为五个 D, 即痛苦、死亡、残疾、经

济损失及药物中毒, 其给人民生活水平的普遍提高和社会发展带来严重影响。SLE 自身免疫的表型特别丰富, 覆盖整个免疫系统, 被认为是自身免疫疾病的原型, 这一代表性的自身免疫疾病是当今国际研究的热点, 也是解决自身免疫疾病的突破口, 对整个基础免疫学的研究也具有重要意义。

SLE 的临床表现复杂多样, 多器官受累, 早期难以确诊, 目前的诊断主要依靠抗原抗体的免疫学检查。SLE 的常规开展抗体项目分为四类, 第一类是敏感性稍高, 但特异性不高, 如荧光总抗核抗体(ANA)、RNP 抗体、SSA 抗体等, 难以用来鉴别诊断各种风湿病亚类<sup>[2-4]</sup>; 第二类抗体项目是敏感性不高, 但特异性高的抗体, 如 ds-DNA 抗体、Sm 抗体, 以及最近应用的抗核小体抗体<sup>[5-14]</sup>, 但检出率仅 10%~30%; 第三类是病情活动程度判断的项目少, 治疗用量缺乏量化依据, 只有 ds-DNA 抗体, 荧光半定量不能准确反映病情变化, 而定量检查需放射同位素法, 一般单位没有条件开展; 第四类为非特异诊断项目, 如血常规、尿蛋白、红细胞沉降率、C 反应蛋白、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 等, 与其他疾病难以鉴别<sup>[15]</sup>。因此, 对于早期 SLE, 大量的假阴性结果易导致误诊<sup>[16]</sup>。长期以来, 临床迫切需要敏感性和特异性都较高的抗体项目, 为临床及时诊断和病情评估提供依据。

在 SLE 的生物治疗方面, 国外已有临床使用 CD20 单抗及 CTLA-4 抗体等生物治疗药物, 原理是因为其分别存在于 T 细胞及 B 细胞上, 通过抗原抗体结合, 选择性删除 T 细胞及 B 细胞, 抑制了 SLE 患者体内过度激活的免疫反应细胞。尽管该类药物具有相对特异性, 但仍然将起正常免疫功能作用的 T、B 细胞也删除了。因此, 临床期待特异性更高、副作用更少的治疗药物, 而关键抗原就是药物寻找的候选靶点。横向分析肿瘤新抗原的发现过程, 以及针对该抗原研制的相关药物, 经临床应用已在某些肿瘤患者身上显示了明显疗效, 如治疗乳腺癌的药物赫赛汀是人源化的 Her-2 单克隆抗体, 与肿瘤细胞上的 Her-2 分子有高度亲和力, 其 95% 为人源化, 致敏源性低, 赫赛汀与 Her-2 特异性结合后一方面能阻止细胞内信号传递, 另一方面也能诱导 NK 细胞和单核巨噬细胞的抗肿瘤作用<sup>[12]</sup>。基于同样原理, 在感染性疾病的预防方面, 也是基于关键靶抗原的免疫预防, 才将曾经全世界流行的多种传染病完全控制消灭。因此, 学术界普遍认为, 关键靶抗原的寻找是 SLE 诊断及预防的突破口。

关于 SLE 中 IFN 诱导的基因高表达这一重要发现, Zhuang 等<sup>[17]</sup>、Lee 和 Reeves<sup>[18]</sup>认为, I 型干扰素是 SLE 治疗的靶目标。加利福尼亚 David Geffen 医学实验室最近发现, 干扰素诱导的 5 个代表基因(LY6E、OAS1、OASL、MX1、ISG15)

\* 基金项目:江苏省卫生厅基金资助项目(H201038)。△ 通讯作者, E-mail:18951670130@189.com。

在狼疮患者中高表达,并与疾病的活动度呈正比,其中 LY6E 与蛋白尿、高 ds-DNA 抗体有关<sup>[19]</sup>。纽约康奈尔大学 Crow 等<sup>[20]</sup>研究发现,用狼疮患者血浆能诱导 WISH 内皮肿瘤细胞株干扰素诱导基因高表达(包括 IFIT1、IFI44、PRKR、MX1、Clorf29、CXCL9), $\alpha$ -干扰素是介导 SLE 的免疫系统激活和紊乱的真正成分。因此, I 型干扰素诱导的信号转导通路在 SLE 的发病机制中起了重要作用<sup>[21-22]</sup>,提示 SLE 的外周血单个核细胞中存在新的自身抗原,而干扰素诱导表达的蛋白可能是候选自身抗原之一。国际上关于 SLE 中的干扰素诱导蛋白的新抗原研究报道较少。德国 Seeling 等<sup>[23]</sup>发现,干扰素诱导的蛋白 16(IFI16)能与 SLE 血清发生抗原抗体结合反应,检出率 35%,类似 ds-DNA 抗体。2006 年意大利都林医学院的研究表明<sup>[24]</sup>,IFI16 抗体检查可用来鉴别诊断硬皮病,局限性硬皮病检出率 28%,弥漫性硬皮病 4%,功能研究显示 IFI16 在血管内皮细胞中诱导了炎症因子的表达。

综合分析认为,SLE 外周血单个核细胞中干扰素诱导的蛋白高表达,当这些细胞(包括 T 细胞、B 细胞、单核细胞等)凋亡或坏死后,高表达的干扰素诱导蛋白质释放,有的被抗原递呈细胞摄取,变成免疫原性蛋白质,触发 T、B 淋巴细胞等一系列的免疫病理反应,引起免疫紊乱,最终导致疾病的发生<sup>[25]</sup>。

### 3 应用 Serex 技术在 SLE 研究中的应用

综上所述,应用 Serex 技术,构建 SLE 外周血单个核细胞中干扰素诱导表达基因的 cDNA 表达文库,通过在噬菌体中转录翻译成蛋白质,表达在噬菌体表面,以蛋白质抗原形式,与 SLE 混合血清进行筛选,筛选出的阳性克隆再经基因测序验证,确定干扰素诱导表达的基因中具有免疫反应性的基因,选出这样具有研究前景的干扰素诱导表达的基因进行后续研究,包括免疫组化分析该抗原在各部位组织器官的表达分布,利用生物信息学对新基因结构和功能进行初步分析和预测;实时荧光定量 PCR 方法检测基因在不同类型细胞(T、B、M $\Phi$ )中的表达差异;计算机辅助获取并分析抗原 CTL 表位,采用固相合成法合成抗原肽,进行临床血清学验证,确定其优势表位,评估其作为临床诊断项目的敏感性和特异性,并以此制备多克隆抗体。

ZAP 定向克隆表达系统成功构建 SLE 外周血细胞 cDNA 表达文库应用美国 Stratagene 公司的 cDNA 说明书,并采用 Stratagene 公司的配套试剂盒,提取 SLE 患者的外周血单个核细胞的 mRNA,确保 RNA 不降解;以带有 Xho I 酶切位点的 oligo(dT)Linker Primer 为反转录引物,再在双链 cDNA 片段的 5'端加 EcoR I adaptor,然后酶切、过柱去除小片段后克隆到 ZAP 表达载体中,用 Gigapack III Gold 包装蛋白进行包装。外源基因在噬菌体中可得到表达,表达的蛋白与血清(抗体)发生免疫反应,筛选反应的阳性克隆;对本课题小组通过基因芯片筛选到的过表达的干扰素诱导表达基因,直接构建噬菌体表达载体,与 SLE 混合血清进行免疫筛选出阳性克隆。筛选出的阳性克隆经核苷酸序列测定,最后采用 NCBI 的网上序列分析软件 BLAST 进行生物信息学分析,有意义的阳性克隆再分别利用健康人血清和单个 SLE 患者血清重复筛选一次,以排除假阳性克隆。抽取 SLE 患者的外周血单个核细胞,应用 MACS 磁珠分选仪等分选技术,提取 T、B、M $\Phi$  细胞中的 mRNA,逆转录成 cDNA,根据靶基因的序列,设计引物,荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达水平,分析差异。将固相合成的抗原肽段,联合福氏佐剂,多次免疫家兔,采用背部多点注射法,两次采血。分离血清,在血清中加入 NaN<sub>3</sub>至终浓度 0.02%,分装后 -20℃ 保存;通过组织活检,免疫组化检测该抗原在皮肤、

肾、唇腺等多个部位的表达分布。通过计算机软件辅助,模拟获取并分析靶抗原 CTL 表位,设计互相覆盖重叠的氨基酸肽段(一般 9 个氨基酸),采用固相合成法,合成抗原肽,与 SLE 单份血清进行免疫反应,筛选出优势表位;与多种风湿病(SLE、pSS、SSc、RA)血清反应,统计其敏感性和特异性,分析临床作为诊断项目的应用价值。

### 参考文献

- [1] Ye S, Pang H, Gu YY, et al. Protein interaction for an interferon-inducible systemic lupus associated gene, IFIT1[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2003, 42: 1155-1163.
- [2] 杜国有,顾向明,方玲. ANA、抗 ds-DNA 抗体及抗 ENA 抗体联合检测在自身免疫性疾病诊断及疗效判断中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(10): 1064-1066.
- [3] 叶萍,许桂芳,叶晓翔,等. 肽抗原 ELISA 检测系统性红斑狼疮患者 rRNP 抗体的临床意义[J]. *中华风湿病学杂志*, 2006, 10(2): 73-76.
- [4] Hiemann R, Buttner T, Krieger T, et al. Challenges of automated screening and differentiation of nonorgan specific autoantibodies on HE Hep2 cells[J]. *Autoimmun Rev*, 2009, 9(20): 17-22.
- [5] 高志芬,陈晓玲. ANA 阴性的 SLE 的实验室检查[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(9): 946-947.
- [6] 汤爱国,皮兰敢,曾立明. 系统性红斑狼疮患者抗核小体抗体检测的意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16(4): 546-549.
- [7] 袁玲玲,卢宪梅,赵天恩. 系统性红斑狼疮患者血清抗核小体抗体水平检测及其临床意义[J]. *中华皮肤科杂志*, 2005, 38(1): 5-7.
- [8] 苏锡康,崔金环,区文华,等. 抗核小体抗体诊断系统性红斑狼疮的价值[J]. *实用医技杂志*, 2011, 18(2): 169-170.
- [9] 秦莉,吴丽娟,王兰兰,等. ELISA 法检测血清抗核小体抗体诊断系统性红斑狼疮价值的系统评价[J]. *中国循证医学杂志*, 2007, 7(3): 204-210.
- [10] 许方,初礼巍. 抗核小体抗体对系统性红斑狼疮的诊断意义[J]. *大连医科大学学报*, 2010, 32(3): 335-338.
- [11] 姜嵘,邵福灵. 抗核小体抗体与系统性红斑狼疮[J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2004, 25(6): 524-528.
- [12] Sahin U, Tureci O, Schmitt H, et al. Human neoplasms elicit multiplespecific immune responses in the autologous host[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(25): 11810-11813.
- [13] 杜国有,顾向明,方玲. ANA、抗 ds-DNA 抗体及抗 ENA 抗体联合检测在自身免疫性疾病诊断及疗效判断中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(10): 1064-1066.
- [14] 陆晓东,成海龙. 系统红斑狼疮和类风湿性关节炎患者 ANA、ENA 多肽谱及抗 ds-DNA 抗体联合检测的意义[J]. *山东医药*, 2009, 49(20): 81.
- [15] 孙明丽,陈美璞,宋杰,等. 一种血液学检测方法对初诊系统性红斑狼疮中的诊断价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 14(3): 301-302.
- [16] 高志芬,陈晓玲. ANA 阴性的 SLE 的实验室检查[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(9): 946-947.
- [17] Zhuang H, Kosboth M, Lee P, et al. Lupus-like disease and high interferon levels corresponding to trisomy of the type I interferon cluster on chromosome 9p[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54: 1573-1579.
- [18] Lee PY, Reeves WH. Type I interferon as a target of treatment in SLE[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2006, 6: 323-330.
- [19] Feng X, Wu H, Hahn BH, et al. Association of increased interferon-inducible gene expression with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Arthri-*

tis Rheum, 2006, 54: 2951-2962.

[20] Hua J, Kirou K, Lee C, et al. Functional assay of type I interferon in systemic lupus erythematosus plasma and association with anti-RNA binding protein autoantibodies [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(6): 1906-1916.

[21] Han GM, Chen SL, Shen N, et al. Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray [J]. Genes Immun, 2003, 4(3): 177-186.

[22] Lars R, Gunnar V. An etiopathogenic role for the type I IFN system in SLE [J]. Trends in Immunol, 2001, 22: 427-431.

[23] Seeling HP, Ehrfeld H, Renz M. Interferon-gamma-inducible protein p16. A new target of antinuclear antibodies in patients with

systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 1994, 37: 1672-1683.

[24] Mondini M, Vidali M, Airò P. A novel autoantigen to differentiate limited cutaneous systemic sclerosis from diffuse cutaneous systemic sclerosis: the interferon-inducible gene IFI16 [J]. De Andream Arthritis Rheum, 2006, 54(12): 3939-3944.

[25] Patrizia C, Francesca G, Claudia Z, et al. A novel role of the interferon-inducible protein IFI16 as inducer of proinflammatory molecules in endothelial cells [J]. J Biol Chem, 2007, 46: 33515-33529.

(收稿日期: 2011-08-20)

• 综 述 •

## 胱抑素 C 的临床意义及其应用进展

魏崇莉<sup>1</sup>综述, 何东元<sup>2</sup>审校

(1. 兰州军区机关门诊部检验科 730030; 2. 甘肃省兰州市解放军第一医院检验科 730030)

**关键词:** 胱氨酸蛋白酶抑制剂; 肾小球滤过率; 糖尿病; 糖尿病肾病

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 02. 023

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2012)02-0182-02

胱抑素 C(Cys C)是胱氨酸蛋白酶的一种抑制剂,是由机体所有有核细胞产生,产生率恒定,不受其他因素(如年龄、性别、饮食、炎症等)的影响。它是由 Anastasi 等在 1983 年首次在鸡蛋清中分离纯化得到的半胱氨酸蛋白酶抑制剂(CPI)后被命名为 Cys C。是一包含 122 个氨基酸残基的非糖化多肽链,相对分子质量  $13.359 \times 10^3$ ,等电点(PI)9.3。在生理条件下,Cys C 的重要功能是抑制内源性半胱氨酸酶的活性,并且可影响中性粒细胞的迁移,对于细胞内蛋白质的转换、骨胶原的降解、蛋白质的分离有重要意义。Cys C 还参与肿瘤的侵袭和转移,参与炎症过程和一些神经性疾病<sup>[1]</sup>。本文就 Cys C 在临床中的意义及其和其他项目联合检测的应用作一综述。

### 1 Cys C 在临床中的意义

**1.1 在各类疾病中的意义** 在肾病早期的诊断中意义非常重大,当内源性肾小球滤过率(GFR)减少到 50,而且血清肌酐值正处在正常值范围时,Cys C 在这个肌酐对疾病反应不灵敏的区域是十分精确的,能够对正在恶化的肾功能进行早期诊断,从而尽可能早地采取治疗措施。同时,Cys C 对较严重的肾衰竭诊断要比肌酐诊断早 1~2 d<sup>[2]</sup>。子痫前期(妊娠期最严重的高血压疾病)有 GFR 下降的特点。所以,准确地检测肾功能能够确保在发展成为血毒症和肾组织损害之前及时分娩。相比于血清尿酸和肌酐而言,Cys C 对于子痫前期是个很好的标志物,并且在检测孕妇是否患有子痫前期方面有很大的价值<sup>[3]</sup>。糖尿病是全世界范围内年轻人肾衰竭最常见的原因,同肌酐相比较,Cys C 对轻度的糖尿病肾病反应灵敏<sup>[4]</sup>。在骨骼肌疾病、四肢瘫痪以及麻痹等疾病的辅助诊断方面,同血清肌酐相比,Cys C 不易受到患者肌肉量的影响,对 GFR 的检测更为可靠<sup>[5]</sup>。针对肾移植的患者,估测 GFR 在对接受肾移植患者的监测中是非常重要的。Cys C 能对强烈的排斥作用提供早期诊断。所以能尽早地产生干预,从而阻止更严重的排斥反应发生。休克时最容易损伤肾脏,监测肾功能损伤的程度在纠正休克时显得尤为重要,Cys C 就是一个较为理想的监测指标<sup>[6]</sup>。有研究表明<sup>[7]</sup>,血清 Cys C 浓度在肝脏疾病中显著升高,且阳性率要高于其他常用肝功能生化指标。一些研究发现,在重度

烧伤、多发性骨髓瘤及过敏性紫癜患者的早期肾损害中,Cys C 也是 1 项很理想的监测肾功能损害的指标<sup>[8-10]</sup>。

**1.2 在各年龄段人群中的应用** 对于老年人而言,GFR 和肌肉量随着年龄的增长而逐渐衰退,而 Cys C 却不为之改变。所以它对于老年人肾组织损伤的早期诊断是非常有优势的<sup>[11]</sup>。

### 2 Cys C 和其他项目联合检测在临床中的应用

**2.1 糖尿病(DM)已经成为危害人类健康的一大重要疾病。**它是一组不同病因的内分泌代谢性疾病,以高血糖为共同特征。糖尿病肾病(DN)是 DM 严重的慢性微血管并发症,也是 DM 患者的主要死因之一,有超过 30% 的患者发展为肾功能衰竭及需要肾透析,因此 DN 的早期诊断和治疗就显得十分重要。一些研究表明<sup>[12-15]</sup>,胱抑素 C 同血清同型半胱氨酸、尿微量清蛋白及尿微量清蛋白/肌酐比值联合检测在 DM 早期 DN 的诊断和治疗中意义巨大。联合检测比单项指标检测的阳性率、准确度和精确度更高。血清同型半胱氨酸、胱抑素 C 及尿微量清蛋白联合检测阳性率达 88.12%,明显高于单项检测<sup>[12]</sup>。同样,血清胱抑素 C 与尿微量清蛋白定期联合检测对 DN 的早期发现、预防、控制、治疗具有重要的临床应用价值<sup>[14]</sup>。血清胱抑素 C 和尿微量清蛋白的联合检测也对临床早期发现糖尿病患者肾损害具有很重要的指导意义<sup>[13,15]</sup>。高敏 C 反应蛋白(HS-CRP)是全身炎症的非特异性标志物,它和胱抑素 C 及尿微量清蛋白的联合检测可提高糖尿病早期肾功能损害检出率,有利于糖尿病继发肾功能损伤的早期预防和治疗<sup>[16]</sup>。HS-CRP 是一种急性时相蛋白,也是全身炎症非特异性标志物,是血管炎症更敏感的指标。当 DM 早期存在慢性炎症时,血中 HS-CRP 也相应升高,尤其是 Cys C 和其联合检测 2 型糖尿病患者时,阳性率为 84.3%,比任何单项检测更能发现糖尿病肾功能损伤,可提高检测的灵敏度<sup>[17]</sup>。邢慧和马晓龙<sup>[18]</sup>研究表明,同对照组相比,Cys C 和  $\alpha$ -L 岩藻糖苷酶(AFU)联合检测糖尿病患者中糖代谢失控组阳性率为 84.4%,单项 Cys C 阳性率为 66.7%,单项 AFU 阳性率为 62.2%,联合检测明显高于单项检测。张素华等<sup>[19]</sup>研究证明,在 2 型糖尿病肾病的早期诊断中 Cys C 是肾小球损伤的 1 项